

University of Groningen

Ceruloplasmine; Een klinisch en experimenteel onderzoek naar oorsprong, voorkomen en eigenschappen van fracties.

Trip, Joan Antonius Joseph

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1968

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Trip, J. A. J. (1968). *Ceruloplasmine; Een klinisch en experimenteel onderzoek naar oorsprong, voorkomen en eigenschappen van fracties*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is opgezet met als uitgangspunt de vraag, of bepaling en fractionering van het serumceruloplasmine bij een aantal ziekten een bijdrage zou kunnen leveren tot de kennis omtrent het ceruloplasminemetabolisme en bovendien van waarde zou kunnen zijn voor de diagnostiek.

Daar reeds bekend was, dat het ceruloplasmine in de lever wordt gesynthetiseerd en dat het bij patiënten, lijdende aan een nefrotisch syndroom, met de urine wordt uitgescheiden, werd het onderzoek beperkt tot patiënten met een leveraandoening of een proteïnurie. De hierbij verkregen resultaten wierpen echter een aantal vragen op, die er toe hebben geleid, dat het onderzoek zich ook buiten de klinische sfeer ging uitstrekken: desondanks leek het gerechtvaardigd ook de hierbij verkregen waarnemingen te vermelden.

Hoofdstuk I geeft een overzicht van de literatuur over ceruloplasmine in het algemeen. Hierbij is niet zo zeer gestreefd naar volledigheid als wel naar het geven van de mogelijkheid een overzicht te krijgen van de huidige stand van zaken betreffende onze kennis van het ceruloplasmine alsmede van de belangrijkste meningen en speculaties, die omtrent een aantal onzekerheden bestaan.

Het in 1944 door Holmberg en Laurell ontdekte ceruloplasmine bevat ongeveer 90% van het serumkoper: het is een blauw gekleurd glycoproteïne met oxydase-eigenschappen. Het mechanisme van de oxydasewerking is niet met zekerheid bekend. Immunologisch is ceruloplasmine specifiek. Met verschillende technieken is het mogelijk, ceruloplasmine in fracties of subeenheden te splitsen. De biologische betekenis er van is nog steeds een onzekere factor.

In hoofdstuk II worden de toegepaste onderzoeksmethoden beschreven. Ceruloplasmine in serum en urine werd gemeten volgens een chromatografisch-spectrofotometrische methode. Het kopergehalte werd bepaald volgens Rice. Fractionering van ceruloplasmine in fractie I (C-C) en fractie II (C-D) werd uitgevoerd door kolomchromatografie over hydroxylapatiet, zoals is aangegeven door Broman. Voor de zetmeelgel-electroforese, de immunoelectroforese en de agardiffusietechniek werden de gebruikelijke daarvoor aangegeven werkwijzen gevolgd.

Bij 24 gezonde personen werden de volgende normale waarden gevonden: serumceruloplasmine 26.3 mg 100 ml (S.D.3.7), serumkoper 98.4 μ g 100 ml (S.D.12.9), fractie I (C-C) 86.7% (S.D.1.3) en fractie II (C-D) 13.3% (S.D.1.3).

Uit de literatuur is bekend, dat patiënten met een nefrotisch syndroom ceruloplasmine uitscheiden met de urine, hetgeen een verlaging van het gehalte in het serum tot gevolg heeft. Richterich deelde mee, dat hij bij dergelijke patiënten bovendien een procentuele toeneming van fractie II (C-D) vond. Om een mogelijke samenhang tussen deze waarnemingen te kunnen

aantonen was een onderzoek op grotere schaal nodig; de resultaten hiervan worden in hoofdstuk III beschreven.

Bij 29 patiënten met proteïnurie werden zowel voor het serumceruloplasmine als het serumkoper significant lagere waarden gevonden dan bij normalen, respectievelijk 19.9 mg 100 ml (S.D. 8.4) en 74.0 μ g 100 ml (S.D. 29.5). Het ceruloplasminegehalte correleerde positief met de totale serumeiwit- en serumalbumineconcentratie (§1).

Bij 21 patiënten werden de ceruloplasminefracties bepaald; fractie I (C-C) was significant kleiner (81.6%, S.D. 4.2) en fractie II (C-D) significant groter (18.4%, S.D. 4.2) in vergelijking met de contrôlepersonen. Het totale serumceruloplasmine toonde een positieve correlatie met fractie I (C-C) en een negatieve correlatie met fractie II (C-D).

De ceruloplasmine uitscheiding (§2) met de urine per 24 uur correleerde negatief met het gehalte in het serum. Een positieve correlatie werd gevonden tussen de klaringen van totaal serumeiwit en van ceruloplasmine. Bovendien kon een negatieve correlatie worden aangetoond tussen de percentages van fractie I (C-C) in het serum en de ceruloplasmineklaringen.

Om een verklaring voor deze waarnemingen te vinden, werden bij 10 patiënten de fracties in de urine bepaald (§3); hierbij bleek, dat de uitscheiding van ceruloplasmine met de urine waarschijnlijk beperkt blijft tot fractie I (C-C). De absolute hoeveelheden (mg 100 ml) van fractie II (C-D) in het serum bleken dan ook niet verschillend te zijn van die bij normalen.

De waarnemingen van Richterich konden hiermee dus worden bevestigd en verklaard. De reden waarom fractie II (C-D) niet in de urine wordt uitgescheiden moet waarschijnlijk worden gezocht in verschillen in grootte of vorm van de moleculen van beide fracties.

In hoofdstuk IV worden de gedragingen van de ceruloplasminefracties bij patiënten met een aantal leverafwijkingen beschreven.

Bij 12 patiënten met hepatitis (§1) waren het ceruloplasminegehalte en het percentage van fractie II (C-D) verhoogd; er bestond geen correlatie tussen deze factoren. Het serumceruloplasmine correleerde positief met het S.G.O.T. Geen der overige leverfunctieproeven toonde enige samenhang met het ceruloplasminegehalte of de fractiepercentages.

17 patiënten met levermetastasen (§2) hadden een verhoogd serumceruloplasminegehalte en een verlaagd percentage voor fractie I (C-C); deze waarden correleerden niet met elkaar doch wel met het S.G.O.T.: in beide gevallen was een negatieve correlatie aanwezig.

37 patiënten met levercirrhose (§3) werden in 4 groepen ingedeeld: alcoholische ($n = 8$), posthepatitische ($n = 9$), biliaire ($n = 4$) en cryptogene ($n = 16$) cirrhose. Alleen de patiënten met een biliaire cirrhose hadden een significant hoger ceruloplasminegehalte dan de normalen. Zowel in de totale patiëntengroep als in de groep met alcoholische cirrhose werd een positieve correlatie tussen ceruloplasmine- en totaal serumeiwitgehalte gevonden. Het serumglobulinegehalte correleerde positief met het ceruloplasminegehalte in de groep met alcoholische cirrhose.

Bij 20 patiënten, ongeacht de aard van de cirrhose, werden de fracties bepaald; fractie I (C-C) was significant lager dan bij de contrôlepersonen. De fractiepercentages correleerden met geen der leverfunctieproeven. Tussen de serumceruloplasminegehalten en de percentages van fractie I (C-C) was een positieve correlatie aantoonbaar.

In §4 kon worden aangetoond, dat de veranderde fractieverhouding onafhankelijk van eventuele stoornissen in de stofwisseling van oestrogene hormonen tot stand komt.

In §5 wordt beschreven dat uit de resultaten, verkregen bij patiënten hepatitis en levermetastasen, geen conclusies kunnen worden getrokken, die een nader inzicht in het ceruloplasminemetabolisme geven. De samenhang tussen ceruloplasminegehalte en fractieverhouding

bij patiënten met levercirrhose doet vermoeden, dat een verminderde ceruloplasminesynthese door de lever voornamelijk ten koste van fractie I (C-C) gaat; op grond hiervan wordt de veronderstelling uitgesproken, dat het voornamelijk fractie I (C-C) is, dat door de lever wordt gesynthetiseerd.

Een laag ceruloplasminegehalte en een afneming van het aandeel van fractie I (C-C) hierin, kan dus worden verwacht bij patiënten met levercirrhose, waar een belangrijk verlies van functionerend leverweefsel is opgetreden.

§1 van hoofdstuk V geeft een overzicht van de resultaten, verkregen door catheterisatie van 25 patiënten met en 12 patiënten zonder een leverafwijking. Bloedmonsters werden in alle gevallen genomen uit de v. hepatica, de v. subclavia en de art. brachialis en in een aantal gevallen tevens uit de v. iliaca externa, de v. jugularis en de v. renalis. Alle gevonden uitkomsten werden steeds beschouwd ten opzichte van de arteriële waarden. In beide patiëntengroepen waren de verschillen steeds van dezelfde orde van grootte.

Het serumkoper- en het serumceruloplasminegehalte waren in de v. hepatica significant hoger, in de v. subclavia en in de v. iliaca externa significant lager dan in de arterie, maar hiervan niet verschillend in de v. jugularis en de v. renalis.

Het vrije kopergehalte in de arterie was lager dan in de v. subclavia en de v. iliaca externa maar verschilde niet ten opzichte van dat in de v. hepatica, de v. jugularis en de v. renalis. Bovendien bleek, dat het ceruloplasmine in de v. subclavia en in de v. iliaca externa, ten opzichte van de art. brachialis, sterker was gedaald dan het totale kopergehalte; dit verschil werd terug gevonden als een toeneming van het gehalte aan vrij koper in deze venen.

In §2 werden bij 16 patiënten (10 met en 6 zonder leverafwijking) de ceruloplasminefracties bepaald in bloedmonsters uit de art. brachialis, de v. subclavia en de v. hepatica. Zowel in procenten als in absolute waarden (mg 100ml) uitgedrukt, was fractie I (C-C) in arterieel bloed significant lager dan in de v. hepatica en significant hoger dan in de v. subclavia. Fractie II (C-D) was, zowel in relatieve als absolute zin, in de art. brachialis significant hoger dan in de v. hepatica en significant lager dan in de v. subclavia. De gevonden verschillen waren ook nu in beide patiëntengroepen van gelijke orde van grootte, met uitzondering van de absolute verschilwaarden van fractie I (C-C) in de art. brachialis en de v. hepatica: bij patiënten met een leverafwijking was het verschil meer uitgesproken. De uitkomsten van de verschillen in ceruloplasmine- en totaal kopergehalte in deze drie vaten waren identiek aan die, welke in het eerste deel van dit hoofdstuk werden waargenomen. Het vrije koper in de v. subclavia was wel hoger dan in de art. brachialis, doch door een wat ongelukkige keuze van de patiënten was dit verschil thans niet significant.

In §3 kon aannemelijk worden gemaakt, dat het arterio-veneuzе verschil in kopergehalte wordt afgevoerd met de lymfe. In 3 lymfemonsters uit de ductus thoracicus kon geen of zeer weinig ceruloplasmine worden aangetoond, doch het kopergehalte was min of meer gelijk aan dat in de v. subclavia.

Een onderzoek door middel van zetmeelgel-electroforese en immunoelectroforese, naar eventuele kwalitatieve verschillen tussen de ceruloplasminefracties uit de v. hepatica, de art. brachialis en de v. subclavia wordt beschreven in §4. Dergelijke verschillen werden niet gevonden.

In §5 tenslotte wordt een beschouwing gewijd aan de diverse mogelijkheden, die aan de gevonden uitslagen ten grondslag zouden kunnen liggen. Door een aantal waarnemingen met elkaar te correleren werd gevonden, dat het percentage van fractie I (C-C) in de v. hepatica positief correleerde met het ceruloplasminegehalte in dit vat. Voorts bleek in de art. brachialis

en in de v. subclavia het procentuele verschil in fractie I (C-C) positief te correleren met het absolute verschil in fractie II (C-D). Op grond van deze bevindingen kon de volgende hypothese worden opgesteld: ceruloplasmine wordt als fractie I (C-C) in de lever gesynthetiseerd; in de periferie angekommen, wordt een hoeveelheid van het ceruloplasmine afgebroken of geïnactiveerd, terwijl een deel van fractie I (C-C) wordt omgezet in fractie II (C-D); hierbij komt een hoeveelheid koper vrij, die ten dele met de lymfe wordt afgevoerd maar bovendien een toeneming van het veneuze gehalte aan vrij koper tot gevolg heeft, niettegenstaande het feit, dat in veneus bloed het totale kopergehalte lager is dan in de arterie. Samenvattend: fractie I (C-C) ontstaat in de lever en fractie II (C-D) ontstaat perifeer uit fractie I (C-C).

Hoofdstuk VI geeft een verslag van het elektronenmicroscopisch onderzoek van de moleculen van de 2 ceruloplasminefracties. De gebruikte contrastmiddelen voor negatieve kleuring waren uranyloxalaat en kaliumfosfowolframaat. Het kaliumfosfowolframaat veroorzaakte een afnemning van de blauwe kleur van het ceruloplasmine, echter met behoud van de oxydase-activiteit; de moleculen werden met deze kleuring duidelijk kleiner afgebeeld, mogelijk door het ontstaan van subeenheden.

Uit de afbeeldingen, verkregen na kleuring met uranyloxalaat, werd het waarschijnlijk, dat ceruloplasminemoleculen cylinders zijn, waarvan de hoogte ongeveer 60 Å en de diameter ongeveer 100 Å bedragen. Er konden geen significante verschillen tussen de grootte van de moleculen van beide fracties worden aangetoond. Zowel van fractie I (C-C) als van fractie II (C-D) toonden de moleculen neiging tot lineaire aggregatie.

Ter aanvulling werd een sedimentatie-analyse uitgevoerd. Voor fractie I (C-C) werd een $S_{20,w}$ gevonden van 7.4; voor fractie II (C-D) werd behalve een 7.8 S piek ook nog een kleine piek met een S-waarde van ongeveer 10 gevonden. Fractie II (C-D) lijkt dus uit twee componenten te bestaan. Een aantal mogelijkheden, die ter verklaring van deze waarnemingen zouden kunnen worden aangevoerd, worden besproken.

This thesis presents the results of some investigations on ceruloplasmin. It started with the question whether estimation and fractionation of serum ceruloplasmin in certain pathological conditions could contribute to our knowledge of the metabolism of this protein, and whether these procedures would be of diagnostic value. Ceruloplasmin is synthesized by the liver and is excreted in the urine in patients with the nephrotic syndrome: investigations were therefore limited mainly to patients with liver disease or proteinuria. The data obtained gave rise to further questions which led to an extension of the investigation beyond the clinical sphere. It seemed justifiable to present these observations as well.

In chapter I a review of the literature on ceruloplasmin is given. This review deals with the presence of copper and ceruloplasmin in the human body, some physical and chemical properties, purification, the presence of ceruloplasmin fractions, immunological aspects, methods for estimation, metabolism and variations in serum content in some diseases. It was not possible to incorporate in this review all the literature that has been published, but it gives an over-all picture of our current knowledge of ceruloplasmin as well as the most important opinions and speculations about some uncertainties.

Ceruloplasmin was discovered in 1944 by Holmberg and Laurell. It contains about 90% of the serum copper. Ceruloplasmin is a blue glycoprotein with oxidase activity. The mechanism of the oxidase activity is not known with certainty. Ceruloplasmin has immunological specificity. With several techniques it is possible to separate ceruloplasmin into fractions or subunits. The biological significance of this protein and its fractions is still obscure.

In chapter II methods and materials are described. Ceruloplasmin in serum and in urine was estimated with a chromatographic-spectrophotometric method according to Deutsch. Serum copper was measured as described by Rice, with oxalyldihydrazide as the substrate. For fractionation of ceruloplasmin Broman's method was used: by chromatography on hydroxylapatite columns fraction I(C-C) and fraction II(C-D) could be separated. Starch-gel electrophoresis, immunoelectrophoresis and agar diffusion were performed according to standard methods.

In 24 healthy subjects (12 females and 12 males) the following normal values were found:

	mean	S.D.
Serum ceruloplasmin	26.3 mg 100 ml	3.7
Total serum copper	98.4 μ g 100 ml	12.8
Free serum copper	8.9 μ g 100 ml	1.4
Fraction I(C-C)	86.7%	1.3
Fraction II(C-D)	13.3%	1.3

No differences were found between the sexes.

From the literature it is known that patients with the nephrotic syndrome have low serum ceruloplasmin levels. This is due to excretion of this protein in the urine. In addition Richterich observed a proportional increase of fraction II(C-D). To clarify any connection between these observations investigations on a larger scale were necessary. The results of these investigations are described in chapter III.

In 29 patients with proteinuria the mean levels of serum ceruloplasmin (19.9 mg 100 ml, S.D. 8.4) as well as of total serum copper (74.0 μ g 100 ml, S.D. 29.5) were significantly lower than in normal controls. A positive correlation could be demonstrated between ceruloplasmin content on the one hand and total serum protein and serum albumin concentrations on the other.

In 21 patients ceruloplasmin fractions were estimated. Fraction I(C-C) was significantly lower (mean 81.6%, S.D. 4.2) and fraction II(C-D) was significantly higher (mean 18.4%, S.D. 4.2) than in healthy subjects. Serum ceruloplasmin contents correlated positively with the percentages of fraction I(C-C) and negatively with the percentages of fraction II(C-D). A negative correlation existed between ceruloplasmin excretions in the urine per 24 h and the serum ceruloplasmin concentrations. A positive correlation was demonstrated between clearances of ceruloplasmin and clearances of total protein (ml per 24 h). Moreover, a negative correlation could be found between the percentages of fraction I(C-C) in serum and the ceruloplasmin clearances.

To find an explanation for these observations the percentages of the ceruloplasmin fractions in the urine were estimated in 10 patients. In 5 of them no fraction II(C-D) could be found in the urine; in the other 5 patients fraction II(C-D) accounted for only 0.5-4.3% of total urinary ceruloplasmin. By immunoelectrophoretic studies the urinary fraction II(C-D) in these 5 patients was identified as fraction I(C-C); chromatographic trailing might be responsible for this phenomenon. For these reasons it could be concluded that urinary excretion of ceruloplasmin in patients with proteinuria is limited to fraction I(C-C). The real values of fraction II(C-D) (i.e. in mg 100 ml) in the serum of the 21 patients were not different from those in normal subjects.

With these data the observations of Richterich could be confirmed and explained. The reason why fraction II(C-D) is not excreted in the urine is discussed; perhaps a difference in size or shape between the molecules of the two fractions may be responsible for this finding.

The behaviour of ceruloplasmin fractions in several diseases of the liver is reported in chapter IV.

In 12 patients with infectious hepatitis the mean serum ceruloplasmin content and the mean percentage of fraction II(C-D) were elevated, 34.7 mg 100 ml (S.D. 10.8) and 19.3% (S.D. 3.8) respectively; no correlation between these data could be shown. Serum ceruloplasmin levels correlated positively with serum glutamic oxaloacetic transaminase (S.G.O.T.) values. None of the other liver function tests correlated with serum ceruloplasmin contents or fraction percentages.

Serum ceruloplasmin concentrations and the percentages of fraction II(C-D) were also increased in 17 patients with liver metastases of malignant tumours. A positive correlation between these parameters and the S.G.O.T. could be demonstrated. No correlation existed between serum ceruloplasmin contents and the percentages of the fractions.

37 patients with cirrhosis of the liver were grouped into 4 categories: alcoholic cirrhosis (n = 8), post-hepatitic cirrhosis (n = 9), biliary cirrhosis (n = 4) and cryptogenic cirrhosis

(n = 16). Only in the patients with biliary cirrhosis the mean serum ceruloplasmin (48.3 mg/100 ml, S.D. 11.7) was significantly higher than in normal subjects. A positive correlation was found between serum ceruloplasmin and total serum protein both in the total patient group and in the group of alcoholic cirrhotics. In the last mentioned group serum ceruloplasmin contents also correlated positively with serum globulin concentrations.

Ceruloplasmin fractions were estimated in 20 patients irrespective of the etiology of their cirrhosis. Fraction I(C-C) was significantly lower (mean 83.1%, S.D. 3.8) than in healthy persons. There was no correlation between the percentages of the fractions and any of the liver function tests. However a positive correlation could be demonstrated between the serum ceruloplasmin concentrations and the percentages of fraction I(C-C).

As is well known, estrogens have some influence on ceruloplasmin synthesis. It has been assumed that estrogen metabolism is disturbed in cirrhosis of the liver, resulting in an augmented action of these hormones. To investigate the possibility that estrogens were responsible for the connections between serum ceruloplasmin contents and the percentages of fraction I(C-C), estrogen excretion with the urine was estimated in 6 patients with cirrhosis; they all had very divergent values for serum ceruloplasmin levels and fraction percentages. Estrogen excretion was within normal limits in all these 6 patients and no correlation with serum ceruloplasmin or percentages of the fractions could be found. In 6 pregnant women (last trimester) ceruloplasmin concentrations were elevated but the percentages of the fractions were not different from normal subjects. It may thus be assumed that the alterations and the correlations of ceruloplasmin and fractions, as demonstrated in patients with liver cirrhosis, occur independently of possible changes in estrogen metabolism.

The results obtained in the patient groups with infectious hepatitis and liver metastases do not add to our understanding in ceruloplasmin metabolism. From the positive correlation between the serum ceruloplasmin contents and the percentages of fraction I(C-C) in patients with cirrhosis of the liver, it may be concluded that decreased synthesis of ceruloplasmin by the liver affects chiefly fraction I(C-C). On these grounds the assumption is made that it is principally fraction I(C-C) that is synthesized by the liver. One may expect lowered serum ceruloplasmin levels and decreased percentages of fraction I(C-C) in those patients with liver cirrhosis, in whom a substantial loss of functioning liver tissue has occurred.

Chapter V gives a review of the results obtained by catheterization studies of 25 patients with and 12 patients without hepatic disease. In each case blood samples were taken from the hepatic vein, the brachial artery and the subclavian vein, and in a few cases from the renal vein, the jugular vein and the external iliac vein too. The estimated differences in both groups of patients were always in the same range. All data obtained were related to the arterial values.

The contents of total serum copper and ceruloplasmin in the brachial artery were significantly lower than in the hepatic vein, equal to the renal and jugular vein and significantly higher than in the subclavian vein and the external iliac vein. The free copper content in arterial serum was significantly lower than in the subclavian vein and the external iliac vein, but equal to the jugular vein, the renal vein and the hepatic vein. The ceruloplasmin content in the subclavian vein and the external iliac vein decreased to a greater extent than the total serum copper content in these vessels. This difference is reflected in the increase of venous free copper concentrations.

Ceruloplasmin fractions in blood samples of the brachial artery, the subclavian vein and the hepatic vein were estimated in 16 patients (10 with and 6 without hepatic disease). In arterial

blood fraction I(C-C) was proportionally as well as quantitatively (mg 100 ml) significantly higher than in the subclavian vein but significantly lower than in the hepatic vein. The arterial fraction II(C-D) was proportionally as well as in absolute values significantly lower than in the subclavian vein but significantly higher than in the hepatic vein. The existence of liver disease had no influence on the magnitude of these differences.

When venous total copper content is lower than its arterial concentration, some copper has been lost: in 3 patients it was possible to compare copper and ceruloplasmin concentrations in serum and lymph. No or a very small amount ceruloplasmin was found in lymph but copper values were almost the same as in serum. From these data it can be concluded that lymph copper consists almost of free copper. It seems probable that part of the arterial serum copper is lost into the lymph. This results in a lower total serum copper content in the subclavian and external iliac vein.

The ceruloplasmin fractions from the brachial artery, the subclavian vein and the hepatic vein might have some qualitative differences. However, with starch-gel electrophoresis (pH 5.5 and 8.3) and immunoelectrophoresis (anti ceruloplasmin anti serum) no such differences could be found.

Finally the results obtained and described in this chapter are discussed. Combining some of the observations it was found that in the hepatic vein the percentages of fraction I(C-C) correlated positively with the ceruloplasmin concentrations: the higher the ceruloplasmin level, the larger the proportion of fraction I (C-C). Moreover, comparing the data from the brachial artery and the subclavian vein a positive correlation could be demonstrated between the proportional differences of fraction I(C-C) and the absolute differences of fraction II(C-D). This means, that the larger the arterio-venous difference of the percentages of fraction I(C-C) is, the more the venous fraction II(C-D) in mg 100 ml serum has increased.

On these grounds the following hypothesis could be formulated: ceruloplasmin is synthesized by the liver as fraction I(C-C). This fraction I(C-C) is transported by the bloodstream to the body tissues and part of it is inactivated or destroyed and another part is transformed to fraction II(C-D). The remaining part is the venous fraction I(C-C). During these processes ceruloplasmin copper is released as free copper: most of this is discharged into the lymphatics. In comparison to the brachial artery these processes result in a changed composition of the blood in the subclavian vein: a lowering of total ceruloplasmin and total copper content, elevation of the free copper concentration, a decrease of fraction I(C-C) and an increase of fraction II(C-D). Finally it is concluded that fraction I(C-C) is synthesized by the liver and that fraction II(C-D) originates from fraction I(C-C).

In these investigations we obtained arguments for this hypothesis from the analysis of blood from the arm and partly from the leg only: no differences were found between arterial and venous blood from kidney and brain. However it is possible that in other compartments of the body the same processes take place.

Chapter VI reports the electron microscopic studies of the molecules of both ceruloplasmin fractions after purification. Negative staining methods with uranyl oxalate and potassium phosphotungstate acid (P.T.A.) was used in all experiments.

A decrease of the blue color of ceruloplasmin was seen after incubation with P.T.A., not with uranyl oxalate. However oxidase activity was not influenced by P.T.A. The molecules were smaller after staining with P.T.A. than with uranyl oxalate: P.T.A.-staining possibly results in subunits by dissociation.

From the figures obtained with uranyl oxalate it seems probable that ceruloplasmin mole-

cules of both fractions are cylinders: the projections are circles and rectangles. The diameter of the circles is about 100 Å, the height is about 60 Å. No significant differences in dimensions could be found between the molecules of fraction I(C-C) and fraction II(C-D). In some instances the molecules of both fractions formed linear aggregations. It may be concluded that ceruloplasmin trends to globular proteins.

Sedimentation velocity experiments were carried out. The sedimentation coefficient of fraction I(C-C) was 7.4 S. Fraction II(C-D) showed two peaks with sedimentation coefficients of 7.8 S and about 10 S. This points to the existence of two components in fraction II(C-D); in electron microscopic studies only one kind of molecule has been seen. Some possible explanations for this fact, especially the existence of dimers or differences in charge, are discussed.